



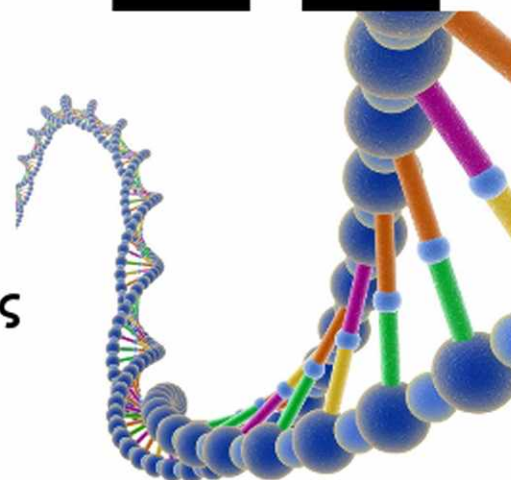
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

ΘΕΜΑ

**Διατροφογενετική: συσχέτιση
πολυμορφισμών γονιδίων με μεταβολικές
διαταραχές στον ελληνικό πληθυσμό**



**Ονοματεπώνυμο Μεταπτυχιακού Φοιτητή:
Παπαδημητρίου Μαρία**

Λάρισα, 2012

**Διατροφογενετική: συσχέτιση πολυμορφισμών γονιδίων με μεταβολικές
διαταραχές στον ελληνικό πληθυσμό**

**Nutrigenetics: association of gene polymorphisms with metabolic
disorders in the Greek population**

Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Σεπτέμβριο του 2011 έως το Φεβρουάριο του 2012. Επιβλέπων Καθηγητής ήταν ο κ. Ζήσης Μαμούρης

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ πολύ όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση και ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γενετικής κ. Ζήση Μαμούρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο project. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Λέκτορα κα Θεολογία Σαραφίδου για την υπομονή, την κατανόηση και την αμέριστη βοήθειά της, καθώς και για όλες τις συμβουλές που μου παρείχε. Επιπλέον, η εργασία αυτή δε θα μπορούσε να υπάρξει χωρίς την πολύτιμη συμβολή του κ. Γιάννη Βασιλόπουλου. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στους υποψήφιους Διδάκτορες, κ. Θεμιστοκλή Γιαννούλη, για όλα όσα μου δίδαξε, και φυσικά στον κ. Γιάννη Γκουτζέλα για την άφογη συνεργασία μας. Τέλος, δράττομαι της ευκαιρίας να ευχαριστήσω όλους όσους δούλευαν στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, φοιτητές και μη, για τη συνεργασία και τη φιλία τους.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κος Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής στο Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κα Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κα Θεολογία Σαραφίδου, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών στο Τμήμα Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	6
1. Παχυσαρκία	
1.1. Εισαγωγικά.....	8
1.2. Δείκτης Μάζας Σώματος.....	9
1.3. Η φυσιολογία της παχυσαρκίας.....	10
1.3.1. Η θεωρία της ενεργειακής ισορροπίας	10
1.3.2. Η θεωρία των λιποκυττάρων	10
1.3.3. Η θεωρία της νευροσυμπεριφορικής διαταραχής	10
1.4 Η γενετική της παχυσαρκίας.....	11
1.4.1 Μονογονιδιακή Παχυσαρκία	11
1.4.2 Συνδρομική Παχυσαρκία	14
1.4.3 Πολυπαραγοντική Παχυσαρκία	15
2. Ο πυρηνικός υποδοχέας VDR	
2.1. Εισαγωγή	18
2.2. Το γονίδιο VDR	18
2.3. Πολυμορφισμοί του γονιδίου VDR.....	19
2.4. Ο ρόλος του VDR.....	20
2.5. Βιταμίνη D και η συσχέτισή της με την παχυσαρκία	22
Σκοπός της εργασίας.....	25
3. Υλικά και Μέθοδοι	
3.1. Απομόνωση DNA.....	27
3.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	27
3.2.1 Αρχή της μεθόδου	27
3.2.2. Υλικά για την PCR.....	29
3.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης.....	30
3.3.1 Αρχή της μεθόδου	30
3.3.2 Προετοιμασία του πηκτώματος και των δειγμάτων	31
3.4. Μέθοδος RFLP	32
3.4.1 Πέψη με ένζυμα περιορισμού.....	32
3.4.2 Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδης	33
3.4.3 Ηλεκτροφόρηση	33
3.4.4 Χρώση με νιτρικό άργυρο.....	34

3.5. Στατιστική Επεξεργασία	35
4. Αποτελέσματα- Συζήτηση	
4.1. Εισαγωγή	37
4.2. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα	37
4.3. Αποτελέσματα PCR	38
4.4. Αποτελέσματα RFLP	39
4.5. Συμπεράσματα.....	43
Παράρτημα	44
Βιβλιογραφία.....	45

Περίληψη

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO), η παχυσαρκία είναι μία από τις σοβαρότερες ασθένειες στον κόσμο. Μέχρι στιγμής, ένα δισεκατομμύριο ενήλικες είναι υπέρβαροι, ενώ περισσότεροι από 300 εκατομμύρια είναι παχύσαρκοι. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, μέχρι το έτος 2015 ο αριθμός των υπέρβαρων ανθρώπων ανά τον κόσμο θα εκτιναχθεί στο 1,5 δισεκατομμύριο.

Η παχυσαρκία είναι μία γενετική νόσος. Αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις παχύσαρκων ατόμων με μεταλλάξεις σε ένα μόνο γονίδιο (μονογονιδιακή παχυσαρκία), η πιο κοινή μορφή της νόσου οφείλεται τόσο σε γονίδια όσο και στην επίδραση του περιβάλλοντος. Τα γονίδια που παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση του φαινοτύπου της παχυσαρκίας έρχονται στο φως με τις μελέτες συσχέτισης.

Σε αυτή την εργασία μελετήσαμε τη συσχέτιση του πολυμορφισμού *TaqI* του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR) με τον παχύσαρκο φαινότυπο.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

1.1. Εισαγωγικά

Ως παχυσαρκία ορίζουμε την κατάσταση στην οποία εισέρχεται το άτομο όταν συσσωρεύει υπερβολικό λιπώδη ιστό. Αυτό που προκαλεί προβλήματα υγείας στον οργανισμό είναι η αύξηση του σωματικού λίπους και όχι το βάρος του ατόμου.

Οι επιπτώσεις αυτής της υπερβολικής αύξησης μπορεί να είναι διάφορες νόσοι ακόμα και μείωση του προσδόκιμου ζωής. Μελέτες έχουν δείξει ότι στην ηλικία των 40 ετών η παχυσαρκία μειώνει το προσδόκιμο ζωής κατά 7 έτη. (A. Peeters, 2003)

Η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με ασθένειες όπως ο διαβήτης, οι καρδιακές παθήσεις, οι μυοσκελετικές παθήσεις και ο καρκίνος (WHO, 2012). Ο κίνδυνος εμφάνισης υπέρτασης είναι πέντε φορές υψηλότερος σε παχύσαρκα άτομα σε σύγκριση με μη παχύσαρκα. Επίσης, φαίνεται ότι στα παχύσαρκα άτομα ο κίνδυνος για στεφανιαία νόσο αυξάνεται κατά 3-6 φορές. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ο κίνδυνος εμφάνισης διαβήτη αυξάνεται όταν υπάρχει παιδική παχυσαρκία, σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό διαβήτη, σε άτομα με κοιλιακή παχυσαρκία, και σε αυτούς που οι μητέρες τους εμφάνισαν διαβήτη κατά την κύηση. Όσον αφορά τον καρκίνο, το 10% των θανάτων λόγω καρκίνου σε μη καπνιστές σχετίζεται με παχυσαρκία. (D.W.Haslam, W.P.T .James, 2005)

Το φαινόμενο της παχυσαρκίας, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, έχει διπλασιαστεί από το 1980. Το 2008, σε όλο τον κόσμο υπήρχαν 1,5 δισεκατομμύρια υπέρβαροι άνθρωποι. Από αυτούς παχύσαρκοι ήταν τα 500 εκατομμύρια, 200 εκατομμύρια άντρες και 300 εκατομμύρια γυναίκες. Συνολικά, το 65% του παγκόσμιου πληθυσμού είναι υπέρβαρο. (WHO, 2012)

Στην Ελλάδα, η πρώτη μεγάλης κλίμακας επιδημιολογική έρευνα που αφορούσε τον επιπολασμό της παχυσαρκίας και τη διανομή του κοιλιακού λίπους στους ενήλικους, έγινε το 2006 από την Ελληνική Ιατρική Εταιρία Παχυσαρκίας (E. Karantais et al, 2006). Η έρευνα έδειξε ότι πολύ μεγάλο ποσοστό του ελληνικού πληθυσμού είναι υπέρβαρο (35,2%), ενώ το 22,5% του πληθυσμού είναι παχύσαρκο. Παρόλο που οι παχύσαρκοι άντρες είναι

περισσότεροι από τις παχύσαρκες γυναίκες, στις γυναίκες φαίνεται ότι η κοιλιακή παχυσαρκία είναι πιο συχνή σε σύγκριση με τους άντρες (35,8% και 26,6% αντίστοιχα).

Μία αντίστοιχη έρευνα ακολούθησε το 2008 στους εφήβους (Tzotzas et al., 2008). Στην ηλικία των 13-19 ετών τα συνολικά ποσοστά των υπέρβαρων και παχύσαρκων αγοριών είναι διπλάσια από τα ποσοστά των κοριτσιών (29,4% και 16,7% αντίστοιχα). Αντίθετα, όπως και στους ενήλικες, τα κορίτσια με κοιλιακή παχυσαρκία βρέθηκαν να είναι περισσότερα (21,7%) από τα αγόρια (13,5%).

Τα αίτια της παχυσαρκίας είναι η ανισορροπία ανάμεσα στην πρόσληψη και την δαπάνη θερμίδων, η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας και οι γενετικοί παράγοντες.

1.2. Δείκτης Μάζας Σώματος

Ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) είναι ένα διαγνωστικό εργαλείο για την εκτίμηση του σωματικού λίπους καθώς αντικατοπτρίζει ικανοποιητικά το ποσοστό σωματικού λίπους στην πλειοψηφία του ενήλικου πληθυσμού (J.C. Seidell, 1997). Για τον υπολογισμό του ΔΜΣ γίνεται συσχέτιση του βάρους με το ύψος ενός ατόμου.

$$\Delta\text{Μ}\Sigma = \frac{\text{βάρους σε kg}}{(\text{ύψος σε m})^2}$$

Στον Πίνακα 1 φαίνεται η κατηγοριοποίηση των ατόμων ανάλογα με το ΔΜΣ, όπως ορίστηκε και προσαρμόστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 2000).

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση ατόμων βάσει του ΔΜΣ

Κατηγορία	ΔΜΣ (kg/m ²)
Λιποβαρής	<18,5
Φυσιολογικός	18,5- 24,99
Υπέρβαρος	25- 29,99
Παχύσαρκος τάξης I	30- 34,99
Παχύσαρκος τάξης II	35-39,99
Παχύσαρκος τάξης III	≥40

Στους ενήλικους άντρες, το φυσιολογικό ποσοστό σωματικού λίπους είναι περίπου 15- 20%, ενώ στις ενήλικες γυναίκες το αντίστοιχο ποσοστό είναι 25- 30% (J.C. Seidell, 1997).

Ένας ακόμα δείκτης ο οποίος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της κοιλιακής παχυσαρκίας είναι η περίμετρος μέσης και η αναλογία μέσης/ ισχίων. Η μέτρηση είναι απλή και δεν σχετίζεται με το ύψος του ατόμου. Επιπλέον, φαίνεται ότι είναι ένας κατά προσέγγιση δείκτης του ενδοκοιλιακού πάχους και του συνολικού σωματικού λίπους (J.C. Seidell, 1997).

1.3. Η φυσιολογία της παχυσαρκίας

Γενικά, έχουν αναπτυχθεί τρεις θεωρίες για να εξηγηθεί η φυσιολογική βάση της παχυσαρκίας. Μεταξύ των θεωριών μπορούν να βρεθούν πολλά αλληλεπικαλυπτόμενα σημεία, αλλά η διαφορά τους είναι ότι εστιάζονται σε διαφορετικούς ιστούς ή συστήματα. (Walley, Asher, & Froguel, 2009).

1.3.1. Η θεωρία της ενεργειακής ισορροπίας

Σύμφωνα με τη θεωρία της ενεργειακής ισορροπίας η παχυσαρκία είναι αποτέλεσμα της επιπλέον πρόσληψης ενέργειας ή της έλλειψης κατανάλωσης ενέργειας

1.3.2. Η θεωρία των λιποκυττάρων

Τα λιποκύτταρα αποθηκεύουν το πλεονάζον λίπος και τριγλυκερίδια. Όταν τα αποθέματα λίπους κινητοποιούνται απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα. Η διόγκωση των λιποκυττάρων λόγω αυξημένης αποθήκευσης λίπους έχει σημαντικό ρόλο στην αύξηση του βάρους στους ενήλικες. Μελέτες έδειξαν ότι η λιπώδης μάζα καθορίζεται από το μέγεθος και τον αριθμό των λιποκυττάρων. (Walley, Asher, & Froguel, 2009).

1.3.3. Η θεωρία της νευροσυμπεριφορικής διαταραχής

Από νευρολογικής πλευράς, η παχυσαρκία είναι αποτέλεσμα νευρολογικού ελέγχου της όρεξης και της πρόσληψης τροφής. Η πλειονότητα των γονιδίων που προκαλούν μονογονιδιακή παχυσαρκία (ήτοι, παχυσαρκία που οφείλεται σε μετάλλαξη ενός μόνο γονιδίου) συμμετέχουν στο μονοπάτι λεπτίνης- μελανοκορτίνης, το οποίο ενέχεται στον έλεγχο της όρεξης. (Walley, Asher, & Froguel, 2009).

1.4. Η γενετική της παχυσαρκίας

Η παχυσαρκία είναι ένα νόσημα το οποίο οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Γενετικά, η παχυσαρκία μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις ενός ή περισσότερων γονιδίων με τη συμβολή ή μη του περιβάλλοντος. Γενικά, διακρίνονται τρεις τύποι παχυσαρκίας: η μονογονιδιακή, η συνδρομική και η πολυπαραγοντική.

1.4.1. Μονογονιδιακή παχυσαρκία

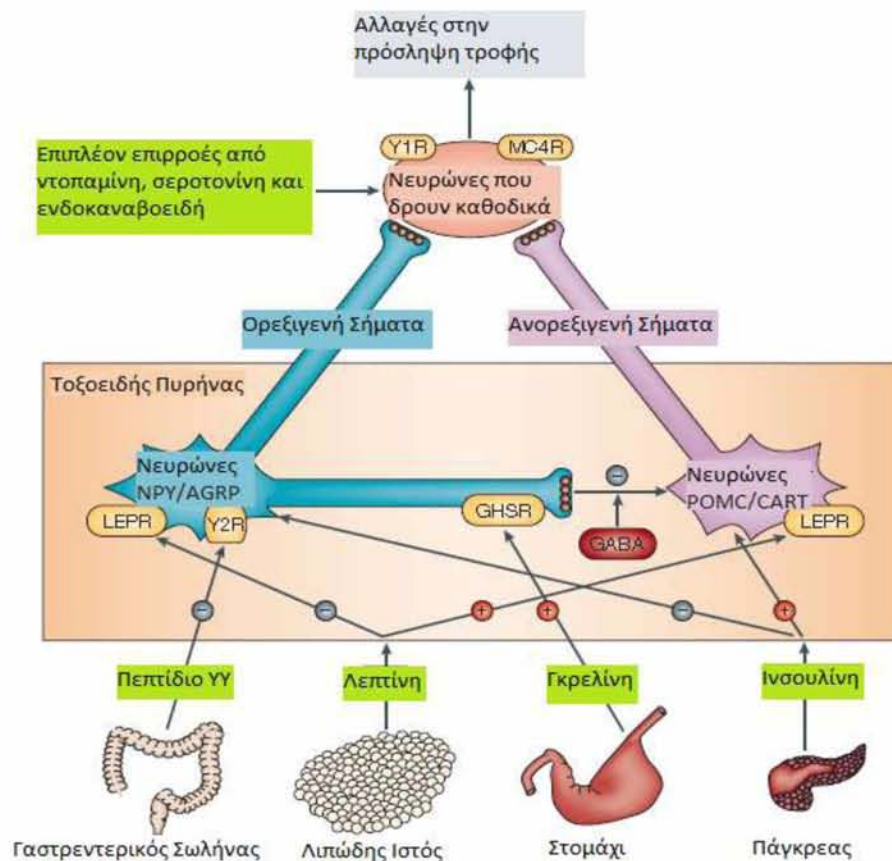
Συγκεκριμένες μορφές μονογονιδιακής παχυσαρκίας οφείλονται σε μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση της όρεξης. Οι περιπτώσεις αυτές εμφανίζουν εξαιρετικά σοβαρούς φαινότυπους που παρουσιάζονται κατά την παιδική ηλικία και συχνά συσχετίζονται με επιπλέον διαταραχές (συμπεριφοράς, ανάπτυξης). Οι πλειονότητα των μεταλλάξεων έχουν ταυτοποιηθεί σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του σηματοδοτικού μονοπατιού λεπτίνης/ μελανοκορτίνης στον υποθάλαμο.

Ο υποθάλαμος είναι ο κεντρικός ρυθμιστής ο οποίος ελέγχει την αίσθηση του κορεσμού καθώς και την ενεργειακή ομοιόσταση. Δέχεται σήματα από διάφορα όργανα και ιστούς, μεταξύ άλλων από το έντερο, μέσω ορμονών όπως η γκρελίνη (ghrelin), το πεπτιδίο YY και η χολεκυστοκινίνη (CCK), από το πάγκρεας μέσω της ινσουλίνης και από το λιπώδη ιστό μέσω της λεπτίνης.

Η λεπτίνη (*LEP*) προσδένεται στον υποδοχέα της (*LEPR*) ο οποίος εντοπίζεται στην επιφάνεια των νευρώνων που παράγουν την agouti- related protein (*AGRP*) και το ορεξιγενές πεπτιδίο Y, και των νευρώνων που παράγουν την προοπιομελανοκορτίνη (*POMC*) και την πρωτεΐνη CART (Cocaine- and Amphetamine- Related Transcript). Και τα δύο είδη νευρώνων βρίσκονται στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου. Ο πρώτος τύπος παράγει ανορεξιογενή σήματα και ο δεύτερος τύπος παράγει σήματα που έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή την προώθηση της πρόσληψης τροφής.

Μετά τη σύνδεση της λεπτίνης στον υποδοχέα της, οι νευρώνες που εκφράζουν *POMC* αναστέλλουν τη σύνθεση της *AGRP*, ενώ η *POMC* τροποποιείται μετα- μεταφραστικά παράγοντας τις ορμόνες- πεπτιδία α-, β- και γ- μελανοτροπίνες (α-, β-, γ- *MSH*). Ο ρόλος της *AGRP* και του πεπτιδίου Y είναι να αναστέλλουν τους υποδοχείς της μελανοκορτίνης 3 και 4 (*MC3R*, *MC4R*).

Ο MC4R εκφράζεται στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου. Η AGRP και η α -MSH συναγωνίζονται για τη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4, η AGRP καταστέλλοντας τη λειτουργία του, και η α -MSH ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι. Όταν καταστέλλεται το σηματοδοτικό μονοπάτι που ξεκινά από τον MC4R, το σήμα είναι ορεξιγενές, ενώ όταν ενεργοποιείται το σήμα είναι ανορεξιγενές. (Bell, 2005 ;Mutch, 2006) Επιπλέον, η μειωμένη έκφραση νευροτροπικών παραγόντων όπως ο BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) καθώς και ο υποδοχέας NTRK2 (Neuro Tropic TyRosine Kinase receptor 2, ή γνωστό αλλιώς ως TRKB, Tropomyosin- Related Kinase B), οι οποίοι δρουν καθοδικά του MC4R, φαίνεται ότι ενέχονται στην ρύθμιση της πρόσληψης τροφής (Walley, 2009)



Εικόνα 1: Σηματοδοτικό μονοπάτι για τον έλεγχο της όρεξης (Mutch, Clement, 2006). Ορμόνες και πεπτιδία, που προέρχονται από διάφορους ιστούς και όργανα, προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς τους στους δύο τύπους νευρώνων (POMC/CART και NPY/AGRP) που εντοπίζονται στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου. Οι νευρώνες, στη συνέχεια, μεταβιβάζουν ορεξιγενή (νευρώνες NPY/AGRP) ή ανορεξιγενή (νευρώνες POMC/CART) σήματα σε νευρώνες που δρουν καθοδικά. Ο συνδυασμός αυτών των σημάτων με άλλα σήματα που προέρχονται από ορμόνες όπως η σεροτονίνη και η ντοπαμίνη καθορίζουν την όρεξη.

Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα παραπάνω γονίδια έχει αποδειχθεί ότι οδηγούν σε μονογονιδιακή παχυσαρκία. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια της λεπτίνης (*LEP*), του υποδοχέα της λεπτίνης (*LEPR*) καθώς και της προοπιομελανοκορτίνης (*POMC*) είναι εξαιρετικά σπάνιες. Η εμφάνισή τους συνήθως συνοδεύεται και από άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως μείωση ή εξασθένιση της γονιμότητας (*LEP* και *LEPR*), μειωμένη ανοσία (*LEP*), κόκκινα μαλλιά (*POMC*) και ανεπάρκεια των επινεφριδίων (*POMC*). (Farooqi, O'Rahilly, 2004)

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη λεπτίνη αναγνωρίστηκε πρώτα σε ποντίκια, και στη συνέχεια διαπιστώθηκε ο ρόλος του και στους ανθρώπους. Μεταλλάξεις σε αυτό αποτέλεσαν την πρώτη αιτία μονογονιδιακής παχυσαρκίας που προσδιορίστηκε στον άνθρωπο. (Zhang, 1994) Οι περιπτώσεις που αναφέρθηκαν αφορούσαν δύο ξαδέρφια πακιστανικής καταγωγής στα οποία τα επίπεδα της λεπτίνης δεν ήταν ανιχνεύσιμα λόγω ομοζυγωτίας μίας μετάλλαξης στο γονίδιο της λεπτίνης. Η μετάλλαξη προκαλείται από τη διαγραφή μίας γουανίνης στο κωδικόνιο 133 η οποία προκαλεί αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και αλλαγή 14 αμινοξέων (Montague, 1997). Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν άλλα τρία άτομα από άλλες δύο οικογένειες, επίσης πακιστανικής καταγωγής (χωρίς αυτές να έχουν συγγενικές σχέσεις), με την ίδια μετάλλαξη. Όλα τα άτομα διακρίνονταν από σοβαρή παχυσαρκία με πρώιμη έναρξη των συμπτωμάτων και έντονη υπερφαγία (Farooqi, 2002).

Η πιο συνηθισμένη μορφή μονογονιδιακής παχυσαρκίας οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (*MC4R*). Μεταλλάξεις του *MC4R* έχουν βρεθεί στο 1-6% των περιπτώσεων παχύσαρκων ατόμων σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες (Lubrano- Berthelie, 2003; Farooqi, 2003)

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *MC4R* μπορεί να προκαλούν διάφορες λειτουργικές ανωμαλίες, όπως μη φυσιολογικό εντοπισμό του *MC4R* στη μεμβράνη, ελάττωμα στην απόκριση του αγωνιστή, και διαταραχή στην ενδοκυτταρική μεταφορά της πρωτεΐνης (Mutch, Clement, 2006)

Από πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια, αποδείχθηκε ότι τα ετερόζυγα άτομα εμφανίζουν φαινότυπους που είναι ανάμεσα στα φυσιολογικά άτομα και τα ομόζυγα knockout ποντίκια (Huszar, 1997). Ο

παχύσαρκος φαινότυπος στα knockout ποντίκια οδήγησε σε σάρωση του *MC4R* του ανθρώπου για ταυτοποίηση μεταλλάξεων. Οι Hinney et al. (2006), έδειξαν ότι οι ετεροζυγώτες μεταλλάξεων *MC4R* (που οδηγούν σε μειωμένη ή απώλεια λειτουργίας) έχουν παρόμοιο δείκτη μάζας σώματος (Δ.Μ.Σ.) με άτομα που δεν φέρουν μετάλλαξη. Εντούτοις, άτομα ομόζυγα σε μετάλλαξη *MC4R* εμφάνιζαν φαινότυπο ακραίας παχυσαρκίας. (Farooqi, 2003) Συνεπώς, μεταλλάξεις στο *MC4R* δεν οδηγούν αυτομάτως σε μονογονιδιακή παχυσαρκία, αλλά θεωρείται ότι αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Hinney, 2010).

1.4.2. Συνδρομική παχυσαρκία

Υπάρχουν τουλάχιστον 20 γενετικά σύνδρομα οι φαινότυποι των οποίων συμπεριλαμβάνουν και αυτόν της παχυσαρκίας. Τα σύνδρομα αυτά μπορεί να οφείλονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες αυτοσωμικών ή φυλετικών χρωμοσωμάτων. Γενικά, τα γενετικά σύνδρομα χαρακτηρίζονται από μία πληθώρα φαινοτύπων, μεταξύ άλλων νοητική υστέρηση, δυσμορφικά χαρακτηριστικά και αναπτυξιακές ανωμαλίες συγκεκριμένων οργάνων.

Το πιο συχνό σύνδρομο, με συχνότητα εμφάνισης 1/25,000 γεννήσεις, είναι το σύνδρομο Prader-Willi (PWS). Τα άτομα με PWS εμφανίζουν μεταξύ άλλων παχυσαρκία, υπερφαγία, μυϊκή υποτονία, νοητική υστέρηση, χαμηλό ανάστημα και υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό.

Το σύνδρομο Prader-Willi είναι αποτέλεσμα του φαινομένου της γονιδιακής αποτύπωσης (genetic imprinting). Τα γενετικά αίτια της εμφάνισης του συνδρόμου είναι, κατά κύριο λόγο, η απώλεια μίας περιοχής του χρωμοσώματος 15 (15q11-q13), λόγω μικροελλείματος (microdeletion). Για την εμφάνιση του συνδρόμου, το χρωμόσωμα με το μικροέλλειμμα πρέπει να έχει κληρονομηθεί από τον πατέρα (πατρικής προέλευσης). Τα αντίστοιχα γονίδια στο μητρικής προέλευσης χρωμόσωμα δεν εκφράζονται, καθώς μεθυλιώνονται κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας της γαμετογένεσης και παραμένουν στη μεθυλιωμένη κατάσταση και κατά την εμβρυογένεση. Η περίπτωση αυτή αντιστοιχεί περίπου στο 70% των ατόμων με σύνδρομο Prader-Willi. Άλλη περίπτωση είναι η μητρική μονογονεϊκή δισωμία, η οποία ευθύνεται για το 25% περίπου των ασθενών, ενώ ένα μικρό ποσοστό, <5%,

οφείλεται σε μεταλλάξεις στην περιοχή αποτύπωσης, οι οποίες οδηγούν σε διαταραχή της μεθυλίωσης (Goldstone, 2004).

Το φαινόμενο της υπερφαγίας, και κατά συνέπεια της παχυσαρκίας ξεκινά στην ηλικία των 1-6 ετών και αν δεν υπάρξει διαιτολογικός έλεγχος, τα άτομα με PWS εμφανίζουν νοσήματα που συνδέονται με την παχυσαρκία, όπως καρδιοπνευμονικές νόσους, διαβήτη τύπου 2, θρομβοφλεβίτιδα, χρόνια οίδημα κάτω άκρων και τελικά θάνατο σε ηλικία μικρότερη των 35 ετών.

Η αιτία της υπερφαγίας στο PWS δεν είναι ακόμα γνωστή. Αν και ο συνδυασμός των συμπτωμάτων της νόσου, όπως η ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης, ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός και η σοβαρή υπερφαγία, υποδηλώνουν κάποια δυσλειτουργία του υποθαλάμου, εντούτοις, δεν υπάρχουν στοιχεία μερικής ή ολικής ανεπάρκειας λεπτίνης στο PWS. Αντιθέτως, σε πρόσφατες μελέτες έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της γκρελίνης (ghrelin) στο πλάσμα -πεπτίδιο που εκκρίνεται στο στομάχι και προωθεί ορεξιγενή σήματα- σε συνθήκες νηστείας είναι πολύ υψηλότερα σε ενήλικους και παιδιά με σύνδρομο Prader- Willi, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την υπερφαγία. Αυτό το φαινόμενο δεν εμφανίζεται στους άλλους τύπους παχυσαρκίας, συμπεριλαμβανομένων και των μονογονιδιακών νοσημάτων λόγω ανεπάρκειας στο μονοπάτι λεπτίνης/ μελανοκορίνης (Delrue, Michaud, 2004)

1.4.3. Πολυπαραγοντική παχυσαρκία

Οι μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια που προκαλούν παχυσαρκία είναι σπάνιες. Συνήθως αυτές οι μορφές παχυσαρκίας είναι πολύ σοβαρές και ξεκινούν από την παιδική ηλικία. Αντιθέτως, οι πιο συχνές μορφές παχυσαρκίας είναι πολυπαραγοντικές οι οποίες αποτελέσμα τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Τα άτομα που έχουν παχύσαρκους γονείς φαίνεται ότι έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να είναι και αυτά παχύσαρκα. Συγκεκριμένα, οι πιθανότητες εμφάνισης παχυσαρκίας αυξάνονται σε άτομα των οποίων οι μητέρες είναι παχύσαρκες. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες πριν ή κατά τη διάρκεια της κύησης, ή σε γενετικούς μηχανισμούς που εξαρτώνται από το φύλο. (Hinney, 2010)

Υπολογίζεται ότι τα γονίδια που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του φαινοτύπου είναι περίπου 100. Εάν ένα άτομο έχει γενετικές παραλλαγές αυτών των γονιδίων οι οποίες αυξάνουν το σωματικό βάρος, τότε το άτομο είναι επιρρεπές στην παχυσαρκία. Εύλογο συμπέρασμα, από τα παραπάνω, είναι ότι η συχνότητα μίας συγκεκριμένης γενετικής παραλλαγής θα είναι αυξημένη στα παχύσαρκα άτομα, σε σύγκριση με άτομα φυσιολογικού βάρους (Hinney, 2010).

Από μελέτες σε διδύμους (twin studies) έχει βρεθεί ότι η κληρονομικότητα της παχυσαρκίας κυμαίνεται μεταξύ του 0,5 και 0,8, γεγονός που υποδεικνύει ότι είναι ένα γενετικό νόσημα, και ότι η επιρροή από το περιβάλλον είναι μάλλον μικρή (Schousboe et al., 2004)

Εκτός από τις σπάνιες περιπτώσεις μονογονιδιακής παχυσαρκίας, το γονίδιο *MC4R* συμμετέχει στη δημιουργία του φαινοτύπου της παχυσαρκίας, και σε πολυπαραγοντικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου *MC4R* (V103I και I251L) έχουν αρνητική συσχέτιση με τον παχύσαρκο φαινότυπο (Hinney, 2010).

Ένα ακόμα γονίδιο το οποίο εκφράζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό είναι το γονίδιο του β_3 - αδρενεργικού υποδοχέα. Ο πολυμορφισμός Trp64Arg έχει συσχετιστεί με το Δ.Μ.Σ.. Άλλα γονίδια όπως ο υποδοχέας της λεπτίνης (*LEPR*) και ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (*GRL*) συσχετίστηκαν με υψηλό Δ.Μ.Σ., αύξηση σωματικού βάρους ή παχυσαρκία σε διάφορους πληθυσμούς. (Wenjie Yang et al, 2007)

Το γονίδιο *FTO* είναι ένα ακόμα υποψήφιο γονίδιο που παίζει ρόλο στη διαμόρφωση του φαινοτύπου της παχυσαρκίας. Αρχικά το *FTO* συσχετίστηκε με το διαβήτη τύπου 2. Στη συνέχεια, έγινε η προσαρμογή για το Δ.Μ.Σ. και αποδείχτηκε ότι η σχέση ανάμεσα στο *FTO* και στο διαβήτη τύπου 2 οφείλεται στον υψηλότερο Δ.Μ.Σ. των διαβητικών ατόμων σε σύγκριση με αυτόν των μη διαβητικών. Το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs9939609 που βρίσκεται στο ιντρόνιο 1 συσχετίστηκε με 31% αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση παχυσαρκίας. (Hinney, 2010)

Γενικά, η παχυσαρκία χαρακτηρίζεται ως ένα σύνθετο νόσημα, το οποίο οφείλεται (με εξαίρεση τις σπάνιες περιπτώσεις μονογονιδιακής παχυσαρκίας) σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ανακάλυψη νέων γονιδίων που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του φαινοτύπου θα

βοηθήσει τόσο στην κατανόηση των μηχανισμών που βρίσκονται πίσω από τα αίτια της συσσώρευσης λίπους όσο και στην μελλοντική ανακάλυψη φαρμάκων για την αντιμετώπιση ή/ και τη θεραπεία της νόσου.

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D, ως πιθανό γονίδιο που μπορεί να παίζει ρόλο στη δημιουργία του φαινοτύπου.

2. Ο πυρηνικός υποδοχέας VDR

2.1. Εισαγωγή

Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, *VDR*) είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας, ο οποίος ανήκει στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση με προσδετο- εξαρτώμενο τρόπο. Αρχικά, ο ρόλος του *VDR* καθορίστηκε ως ο διαμεσολαβητής της δράσης της ενεργής μορφής της βιταμίνης D, 1,25(OH)₂D₃ ή καλσιτριόλης, στην φυσιολογική ασβέστωση των οστών και την οστική αναδιαμόρφωση.

Ωστόσο, ο ρόλος του *VDR* δεν περιορίζεται μόνο στην εντερική απορρόφηση του ασβεστίου, αλλά ενέχεται και σε μία πληθώρα άλλων φυσιολογικών δραστηριοτήτων του οργανισμού, που λαμβάνουν χώρα σε συστήματα όπως το ανοσολογικό, το νευρικό, το ενδοκρινολογικό, και σε ιστούς όπως ο επιθηλιακός (Haussler et al., 1998).

2.2. Το γονίδιο VDR

Το cDNA του *VDR* του ανθρώπου κλωνοποιήθηκε από τους Baker et al. (1988), αλλά η δομή του γονιδίου περιγράφηκε σχεδόν μία δεκαετία αργότερα από τους Miyamoto et al. (1997). Το *VDR* εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 12, και το μέγεθός του είναι περίπου 75kb.

Το γονίδιο *VDR* έχει 11 εξώνια. Τρία από αυτά (1A, 1B και 1C) αποτελούν την 5' μη κωδική περιοχή, ενώ το κωδικό μέρος αποτελείται από 8 εξώνια (2-9). Η οργάνωση του γονιδίου *VDR* έχει πολλά κοινά στοιχεία με την οργάνωση γονιδίων άλλων υποδοχέων στεροειδών ορμονών, όπως ο υποδοχέας της θυρεοειδούς ορμόνης, των οιστρογόνων και των ανδρογόνων. Από τον υποκινητή του γονιδίου *VDR* λείπει το κουτί TATA (TATA-box), ενώ αντίθετα η περιοχή είναι πλούσια σε κατάλοιπα GC (Miyamoto et al., 1997)

Στο νεφρικό ιστό βρέθηκαν τρία εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *VDR*. Τα τρία mRNA προέκυψαν από εναλλακτική συναρμογή δύο εξωνίων, του 1B και 1C. Στην πρώτη περίπτωση έχει εξαιρεθεί το εξώνιο 1B ενώ στη δεύτερη περίπτωση έχουν εξαιρεθεί τα 1B και 1C. Το τρίτο εναλλακτικό μετάγραφο περιέχει όλα τα εξώνια (1A, 1B, 1C). (Miyamoto et al., 1997)

Στο εξώνιο 2 ταυτοποιήθηκε ένας πολυμορφισμός ο οποίος παίζει ρόλο στη θέση έναρξης της μετάφρασης. Συγκεκριμένα, η αλλαγή του

νουκλεοτιδίου T σε C έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του σημείου έναρξης της μετάφρασης και συνεπώς τη σύνθεση μίας πρωτεΐνης η οποία έχει 3 αμινοξέα λιγότερα (424 αντί 427). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι γνωστός ως *FokI* και έχει ονομαστεί έτσι λόγω της θέσης αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο *FokI*. (Miyamoto et al., 1997)

2.3. Πολυμορφισμοί του γονιδίου VDR

Καθ' όλο το μήκος του γονιδίου *VDR* έχουν βρεθεί πολλοί πολυμορφισμοί οι οποίοι εντοπίζονται τόσο στα εξώνια όσο και στα ιντρόνια. Πολλοί από αυτούς έχουν συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες (π.χ. οστεοπόρωση, καρκίνος, διαβήτης κτλ). Όσον αφορά τον καρκίνο, ο *VDR* φαίνεται ότι ενέχεται στους μηχανισμούς που ελέγχουν την εμφάνιση και την έκβαση της νόσου. Στον καρκίνο του προστάτη έχει προταθεί η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών του *VDR* και την εξέλιξη της νόσου, ενώ πολυμορφισμοί του γονιδίου παίζουν ρόλο στο κακοήθες μελάνωμα, στον καρκίνο του μαστού (Kostner et al., 2009).

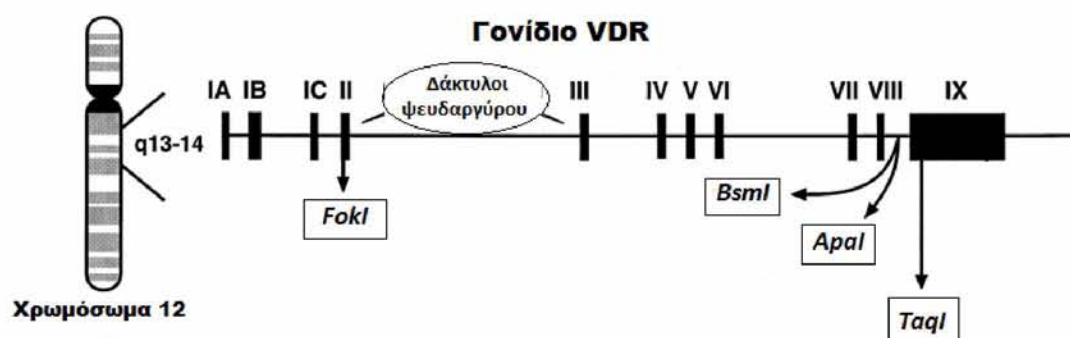
Από τους πολυμορφισμούς μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLPs, Restricted Fragment Length Polymorphisms), που έχουν βρεθεί στο κωδικό τμήμα του *VDR*, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο *FokI* (rs 2228570) στο εξώνιο 2, ο οποίος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλλάζει τη θέση έναρξης της μετάφρασης. Ο υποδοχέας με τα 424 αμινοξέα φαίνεται ότι περισσότερο αποτελεσματικός στην ενεργοποίηση της μεταγραφής των VDRE (Vitamin D Response Elements, στοιχεία απόκρισης βιταμίνης D). (Haussler et al, 1998)

Επιπλέον αρκετοί πολυμορφισμοί εντοπίζονται στο 3' άκρο του *VDR*. Πρόκειται για τα RFLPs *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* και *EcoRV*. Οι πολυμορφισμοί *FokI* (εξώνιο 2) και *TaqI* (εξώνιο 9) είναι οι μόνοι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν στην κωδική περιοχή του *VDR* (Uitterlinden et al., 2004). Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει κάποια γνωστή αλλαγή στη λειτουργία του υποδοχέα λόγω των πολυμορφισμών.

Ο πολυμορφισμός *BsmI* (rs 1544410) εντοπίζεται στο ιντρόνιο 8 και έχει συσχετιστεί με την οστική πυκνότητα. Συγκεκριμένα, η απουσία της θέσης περιορισμού συσχετίζεται με μειωμένα επίπεδα οστικής πυκνότητας, σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, όπως η ηλικία, η εθνικότητα, τα επίπεδα

οιστρογόνων και η πρόσληψη ασβεστίου (Haussler et al., 1998). Επιπλέον, ο πολυμορφισμός *BsmI* συσχετίστηκε με κάποια είδη καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του δέρματος (Kostner et al., 2009).

Οι πολυμορφισμοί *BsmI* και *TaqI* (rs 731236) έχουν συσχετιστεί με την προδιάθεση στην παχυσαρκία σε άτομα που έχουν διαγνωστεί με διαβήτη πρώιμης εμφάνισης. Συγκεκριμένα, ο γονότυπος TT του πολυμορφισμού *TaqI* και ο γονότυπος bb του *BsmI* αντιπροσώπευαν μία διαφορά περίπου 9 κιλών σε σύγκριση με άλλους γονοτύπους (Wei-Zhen Ye et al., 2001)



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της γενωμικής οργάνωσης του γονιδίου VDR (Haussler et al, 1998). Το γονίδιο VDR έχει 11 εξώνια. Στα εξώνια 2 και 9 εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί *FokI* και *TaqI* αντίστοιχα. Οι πολυμορφισμοί *BsmI* και *ApaI* εντοπίζονται στο ιντρόνιο 9. Από τα εξώνια 2 και 3 σχηματίζονται οι δάκτυλοι ψευδαργύρου.

2.4. Ο ρόλος του VDR

Ο πυρηνικός υποδοχέας της βιταμίνης D είναι ο διαμεσολαβητής της δράσης της βιταμίνης D. Ο VDR σχηματίζει ετεροδιμερή με τον υποδοχέα του ρετινοειδούς X, RXR, και προσδένεται σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA, οι οποίες ονομάζονται στοιχεία απόκρισης βιταμίνης D (Vitamin D Response Elements, VDRE). Η πρόσδεση του ετεροδιμερισμένου υποδοχέα στο VDRE προκαλεί μεταγραφική ενεργοποίηση. Οι λειτουργίες του VDR είναι α) η δέσμευση της βιταμίνης D, β) ο ετεροδιμερισμός με τον υποδοχέα του ρετινοειδούς X (RXR), γ) η πρόσδεση στο DNA και δ) η μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων.

Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA είναι μία συντηρημένη περιοχή που συνίσταται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger motifs). Στο καρβοτελικό άκρο κάθε δακτύλου ψευδαργύρου υπάρχει μία α-έλικα (Α και

B). Από τις δύο έλικες, η μία αναγνωρίζει το DNA (έλικα A) και η άλλη προσδένεται πάνω στο φωσφοδιεστερικό σκελετό (έλικα B).

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του υποδοχέα VDR είναι η ύπαρξη ενός συνόλου πέντε βασικών αμινοξέων μεταξύ των δύο δακτύλων ψευδαργύρου. Η περιοχή αυτή είναι θετικά φορτισμένη και βοηθά στην πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA καθώς και στον πυρηνικό εντοπισμό. Επιπλέον, το κατάλοιπο σερίνης που υπάρχει μεταξύ των πέντε αμινοξέων φωσφορυλιώνεται από την κινάση C και αποτρέπει την πρόσδεση στο στοιχείο απόκρισης της βιταμίνης D (VDRE).

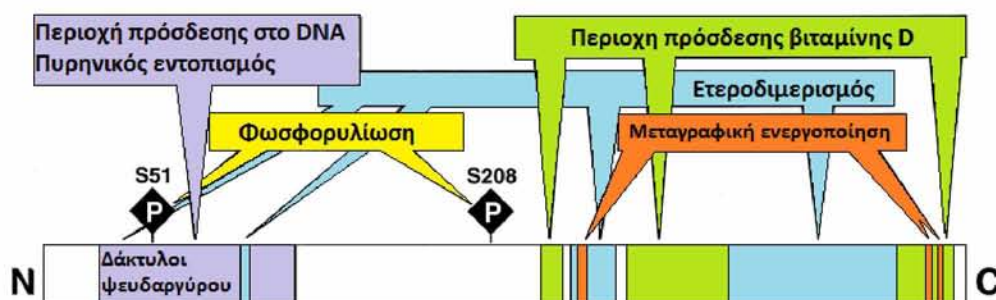
Έχουν προταθεί δύο μοντέλα που εξηγούν τον τρόπο που γίνεται ο πυρηνικός εντοπισμός του υποδοχέα. Στην πρώτη μελέτη προτάθηκε ότι για την πυρηνική συσσώρευση χρειάζεται ένα διμερές σήμα που αποτελείται από βασικά αμινοξέα τα οποία βρίσκονται στο κάθε άκρο της αλληλουχίας, μεταξύ των καταλοίπων 78-105. Στη δεύτερη μελέτη αναγνωρίστηκε μία δεύτερη βασική αλληλουχία, η οποία βρίσκεται μεταξύ των δύο δακτύλων ψευδαργύρου, και αποτελεί ένα δεύτερο σήμα. Και οι τρεις ομάδες βασικών αμινοξέων στις τρεις έλικες (A, B και C) είναι συντηρημένες, αλλά δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν λειτουργούν μαζί ή ανεξάρτητα για τον πυρηνικό εντοπισμό.

Η περιοχή δέσμευσης της βιταμίνης D στο VDR μοιάζει πολύ με την αντίστοιχη περιοχή στους υπόλοιπους πυρηνικούς υποδοχείς. Η περιοχή αποτελείται από 12 α- έλικες και αρκετά β- φύλλα, τα οποία σχηματίζουν ένα «σάντουιτς». Ο συνδυασμός των δύο μοτίβων διαμορφώνεται στο χώρο ώστε να δημιουργηθεί μία λιπόφιλη «τσέπη», μέσα στην οποία προσδένεται η βιταμίνη D.

Οι αλληλουχίες που ενέχονται στον διμερισμό του υποδοχέα με άλλα μόρια βρίσκονται στο πρώτο δάκτυλο ψευδαργύρου, στο καρβοτελικό άκρο του δεύτερου δακτύλου ψευδαργύρου, και στο καρβοτελικό άκρο της θέσης πρόσδεσης του συνδέτη. Ο ετεροδιμερισμός ανάμεσα στον VDR και το RXR γίνεται με τη διαμεσολάβηση δύο καταλοίπων του VDR, της Lys-91 και Glu-92.

Για τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων απαιτούνται τουλάχιστο δύο περιοχές. Σε μία από αυτές υπάρχει ένα κατάλοιπο λυσίνης (Lys-246), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Η

ενεργοποίηση της δεύτερης περιοχής είναι προσδετο- εξαρτώμενη και είναι γνωστή ως AF-2. Η AF-2 αντιστοιχεί στην έλικα- 12 της περιοχής δέσμευσης του ορμονικού συνδέτη. Η δυνατότητα του VDR να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση από κινάσες. (Haussler et al., 1998)



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της γραμμικής αμινοξικής αλληλουχίας (Haussler et al., 1998).

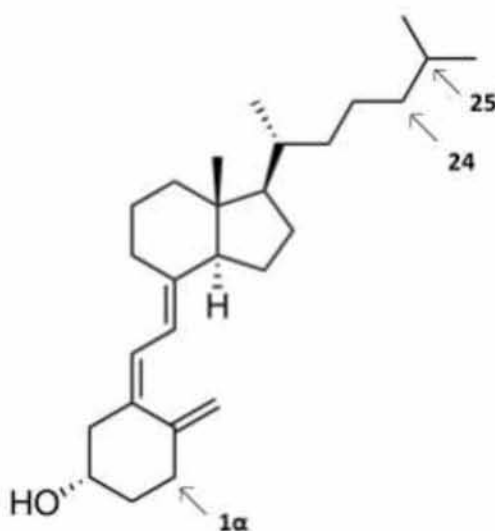
2.5. Βιταμίνη D και η συσχέτισή της με την παχυσαρκία

Η βιταμίνη D είναι μία στεροειδής ορμόνη, ο ρόλος της οποίας δεν περιορίζεται μόνο στην ομοιοστάση του ασβεστίου, αλλά ενέχεται και σε άλλα συστήματα, όπως το ανοσολογικό.

Η βιταμίνη D εισέρχεται στο σώμα μέσω των τροφών, υπό τη μορφή βιταμίνης D3 και D2, ή συντίθεται στο δέρμα υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας B, η οποία μετατρέπει την 7- διυδροχοληστερόλη σε χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D3, Εικόνα 4), η οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος δεσμευμένη σε μία πρωτεΐνη- μεταφορέα (DBP, vitamin D Binding Protein). (Atif B. Awad, 2012)

Για να ενεργοποιηθεί, η βιταμίνη D πρέπει να υδροξυλιωθεί σε δύο θέσεις, τις 1α και 25 και να σχηματίσει την 1,25(OH)₂D₃ ή καλσιτριόλη. Η υδροξυλίωση-25 γίνεται στο ήπαρ από ισομορφές του κυτοχρώματος P250 (σχηματισμός 25(OH)D₃ ή καλσιδιόλη). Τα χαμηλά επίπεδα ασβεστίου διεγείρουν την παραθυρεοειδή ορμόνη (PTH), η οποία προάγει την υδροξυλίωση της καλσιδιόλης στη θέση 1α προς το σχηματισμό καλσιτριόλης. Η υδροξυλίωση-1α λαμβάνει χώρα στα νεφρά, αλλά και σε άλλα όργανα/ ιστούς/ κύτταρα, όπως το δέρμα, τα οστά, οι χόνδροι και τα μακροφάγα (X. Palomer et al., 2008)

Τα επίπεδα της βιταμίνης D που υπάρχει στο σώμα ελέγχονται αυστηρά. Πρώτον, ο χρόνος ημιζωής της ενεργής μορφής της βιταμίνης D είναι περιορισμένος. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ημιζωής της καλσιτριόλης είναι περίπου 6 ώρες, ενώ της καλσιδιόλης 2-3 εβδομάδες. Ένα δεύτερο σημείο ελέγχου είναι η δράση της παραθυρεοειδούς ορμόνης (PTH). Στα νεφρά η υδροξυλίωση του καταλοίπου 1α εξαρτάται από την PTH. Στο ήπαρ και στους νεφρούς παράγεται το ένζυμο 24- υδροξυλάση το οποίο μετατρέπει την καλσιδιόλη σε 24,25(OH)₂D₃ και την καλσιτριόλη σε 1,24,25(OH)₃D₃ αντίστοιχα. Τα 24,25(OH)₂D₃ και 1,24,25(OH)₃D₃ είναι ανενεργά και αποβάλλονται από το σώμα μέσω της χολής και των ούρων (Atif B. Awad, 2012).



Εικόνα 4: Βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη). Στην εικόνα παρουσιάζονται με βέλη οι θέσεις υδροξυλίωσης (1α, 24 και 25)(www.Wikipedia.org)

Η αύξηση της μάζας του λιπώδους ιστού προϋποθέτει την αύξηση του αριθμού και τη διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων. Για τη διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων απαιτούνται μία με δύο διαιρέσεις, σε χρονικό διάστημα 4-7 ημερών. Μετά από αυτή τη διαδικασία, η διαφοροποίησή τους σταματάει και εισέρχονται σε μία φάση μιτωτικής κλωνικής επέκτασης, η οποία χαρακτηρίζεται από την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων C/EBPβ και C/EBPσ, και περιλαμβάνει μία με δύο διαιρέσεις. Η ινσουλίνη, τα γλυκοκορτικοειδή και ο αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης είναι απαραίτητα σε αυτή τη φάση. Στο επόμενο στάδιο εντείνεται η διαδικασία της τελικής διαφοροποίησης προς ώριμα λιποκύτταρα, και εκφράζονται μεταγραφικοί

παράγοντες όπως ο C/EBPα και οPPARγ. Εκτός από τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων, τα ώριμα λιποκύτταρα εκφράζουν δείκτες της τελικής φάσης διαφοροποίησης (π.χ. fattyacylsynthase, LPG, glucosetransporter 4, κτλ).

Τα τελευταία 25 χρόνια έχουν γίνει μελέτες που έχουν δείξει ότι η καλσιτριόλη αναστέλλει τη διαφοροποίηση των προ-λιποκυττάρων. Συγκεκριμένα, η βιταμίνη D₃ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των προ-λιποκυττάρων του χοίρου και καταστέλλει την έκφραση μορίων που προκαλούν διαφοροποίηση όπως ο PPARγ και ο υποδοχέας α του ρετινοειδούς X. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η βιταμίνη D₃ μειώνει την έκφραση και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με τη συσσώρευση λιπώδους ιστού, όπως η LDL (Low- Density Lipoprotein, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας), η φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξυλάση και άλλα (Atif B. Awad, 2012).

Ο τρόπος με το οποίο η βιταμίνη D μειώνει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων βασίζεται στον υποδοχέα της (VDR). Με την αύξηση της βιταμίνης D αυξάνεται η έκφραση του υποδοχέα VDR. Η βιταμίνη D μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα PPARγ και ανταγωνίζεται την δραστηριότητά του. Αντίθετα, σταθεροποιεί τους υποδοχείς της. Επίσης, έχει προταθεί ότι η συμμετοχή της βιταμίνης D στην αναστολή των παραπάνω παραγόντων σχετίζεται με την καταστολή της έκφρασης των υποδοχέων της τριωδοθυρονίνης, η οποία ενέχεται στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Ωστόσο, η δράση της βιταμίνης D δεν είναι πάντα ανασταλτική ως προς τους παράγοντες που προάγουν τη διαφοροποίηση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η βιταμίνη D προωθεί αντί να αναστέλλει τη διαφοροποίηση. Συνεπώς, η δράση της εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο, καθώς η καλσιτριόλη δρα ανασταλτικά μόνο κατά το αναπτυξιακό στάδιο της μιτωτικής κλωνικής επέκτασης (Atif B. Awad, 2012).

Συμπερασματικά, η βιταμίνη D μέσω του υποδοχέα της καταστέλλει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και συνεπώς της αύξησης της μάζας του λιπώδους ιστού. Επιπλέον, καταστέλλει την έκφραση μορίων που συμβάλουν στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Εύλογο από τα παραπάνω, συμπέρασμα είναι ότι η βιταμίνη D δρα προστατευτικά απέναντι στην αύξηση του σωματικού λίπους, και επομένως στην παχυσαρκία.

Σκοπός της εργασίας

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε ο πολυμορφισμός *TaqI* του γονιδίου *VDR* με σκοπό να διαπιστωθεί εάν έχει συσχέτιση με την παχυσαρκία. Τα άτομα που έλαβαν μέρος στη μελέτη προέρχονται από τη Βόρεια Ελλάδα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε στο Διαβητολογικό Κέντρο της Α' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ της Θεσσαλονίκης. Όλα τα άτομα (ασθενείς και μη ασθενείς) που συμμετείχαν στη μελέτη έχουν υψηλό μέσο όρο ηλικίας και προέρχονται από περιοχές της Βόρειας Ελλάδας.

Από τους ασθενείς και τους μη ασθενείς συλλέχθηκε αίμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση περιγράφεται παρακάτω και βασίζεται στην επώαση με πρωτεΐνάση K, εκχυλίσεις με φαινόλη/ χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Η πρωτεΐνάση K διασπά τις πρωτεΐνες. Οι εκχυλίσεις με τη φαινόλη χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των νουκλεϊκών οξέων, ενώ το χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των φάσεων. Το SDS είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό το οποίο διασπά την πυρηνική μεμβράνη και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες- μεταξύ αυτών και τις νουκλεάσες που διασπούν το DNA.

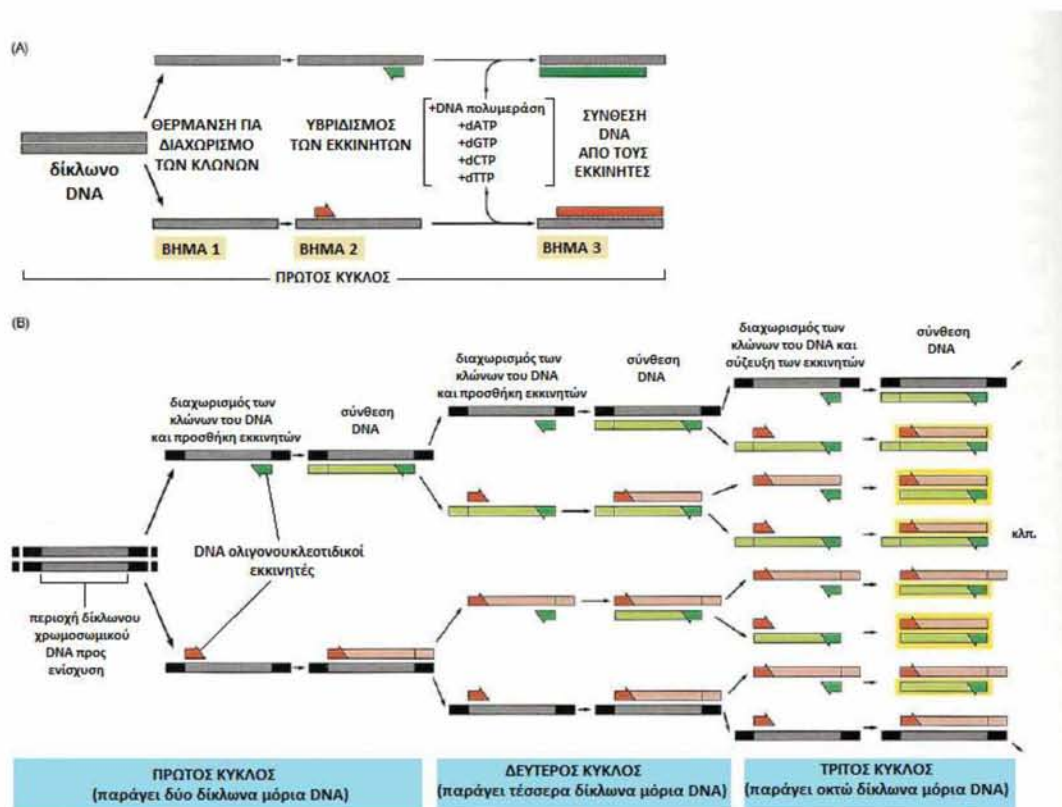
Εκτός από την απομόνωση του DNA, το αίμα των ασθενών συλλέχθηκε και αναλύθηκε για την συλλογή κλινικών και βιοχημικών παραμέτρων (HDL, LDL, Τριγλυκερίδια).

3.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

3.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ή PCR είναι μία τεχνική που στοχεύει στην ενίσχυση ενός τμήματος DNA σε εκατομμύρια πανομοιότυπα αντίγραφα. Κατά την PCR επιμηκύνεται ένα τμήμα DNA με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράσης από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermusaquaticus*. Για την αντίδραση απαιτούνται δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers), οι οποίοι έχουν μήκος 15- 25 βάσεις. Κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός ως προς μία αλληλουχία του DNA στόχου, ο κάθε ένας σε διαφορετικό κλώνο και έχουν παρόμοιο T_m (θερμοκρασία τήξης). Επιπλέον, για την αντίδραση χρειάζονται: ρυθμιστικό διάλυμα (Tris- HCl με pH 8,3- 8,8), δισθενή κατιόντα

(συνήθως Mg^{+2} , υπό τη μορφή $MgCl_2$), και τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της PCR (Alberts et al., 2006)

Στην αντίδραση μπορούν να διακριθούν τρία στάδια, το καθένα από τα οποία έχει διαφορετική διάρκεια και διεξάγεται σε διαφορετική θερμοκρασία. Το πρώτο στάδιο είναι η αποδιάταξη του DNA στόχου (denaturation). Αυτό επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες μεταξύ $94^{\circ}C$ και $95^{\circ}C$, και έχει διάρκεια ~40 sec. Σε αυτό το στάδιο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου των συμπληρωματικών βάσεων. Το δεύτερο στάδιο είναι η υβριδοποίηση των εκκινήτων (annealing). Η θερμοκρασία μειώνεται στους $50^{\circ}C$ έως $60^{\circ}C$. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) εξαρτάται από τη σύσταση των εκκινήτων σε AT-CG, και συνήθως είναι $2-10^{\circ}C$ χαμηλότερη από το T_m . Το δεύτερο στάδιο έχει διάρκεια 30- 60 sec. Το τρίτο στάδιο της αντίδρασης είναι η επιμήκυνση (extension). Σε αυτό το βήμα η *Taq* πολυμεράση συνθέτει νέους κλώνους με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$. Η βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού εξαρτάται από την πολυμεράση και είναι $\sim 72^{\circ}C$ ενώ ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση του σταδίου εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος που

ενισχύεται. Η *Taq* πολυμεράση συνθέτει περίπου 1,000- 2,000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Το σύνολο των τριών σταδίων αποτελούν ένα κύκλο ενώ μία αντίδραση PCR περιλαμβάνει 35- 40 κύκλους (Sambrook et al., 2001)

3.2.2. Υλικά για την PCR

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για το *VDR* rs 731236 είναι οι ακόλουθες:

ForwardPrimer: 5'- GGAGAAGTCACTGGAGGGC - 3'

Reverse Primer: 5'- GGATCATCTTGGCATAGAGC - 3'

Για τον πολυμορφισμό που μελετήθηκε χρησιμοποιήθηκε το PCR Kit της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις και οι ποσότητές τους.

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια PCR

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Ποσότητα
DNA	-	~100- 200 ng	1-3 µl
Primer Forward	50 pmol/ µl	1 pmol/ µl	0,6 µl
Primer Reverse	50 pmol/ µl	1 pmol/ µl	0,6 µl
dNTPs	10mM	0,2mM	0,6µl
Buffer	10x	1x	3 µl
MgCl ₂	25mM	2,25mM	2,7 µl
dH ₂ O	-	-	21,15 µl- 23,15 µl
Taq pol	5 U/µl	1 U	0,15 µl
Σύνολο	-	-	30 µl

Οι συνθήκες της PCR για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό φαίνονται στον Πίνακα 3

Πίνακας 3: Συνθήκες PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
1. Αρχική Αποδιάταξη	94°C	4 min
2. Αποδιάταξη (denaturation)	94°C	40 sec
3. Υβριδοποίηση Εκκινητών (annealing)	60°C	50 sec
4. Επέκταση (extension)	72°C	1 min
5. Τελική Επέκταση	72°C	10 min

Η αντίδραση ξεκινάει με το βήμα 1 (αρχική αποδιάταξη) και συνεχίζει μέχρι και το βήμα 4 (επέκταση). Στη συνέχεια επαναλαμβάνονται τα βήματα 2-4 για άλλους 34 κύκλους. Η αντίδραση τελειώνει με την ολοκλήρωση του βήματος 5 (τελική επέκταση).

3.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

3.3.1. Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα της αγαρόζης γίνεται τον έλεγχο των προϊόντων της PCR. Η κινητικότητα των μορίων έχει κατεύθυνση από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+), γεγονός που οφείλεται στο αρνητικό φορτίο των φωσφοδιεστερικών ομάδων του DNA. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την κίνηση των μορίων στο πήκτωμα είναι:

1. το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA. Η μετακίνηση είναι αντιστρόφως ανάλογη με το \log_{10} του αριθμού των ζευγών βάσεων
2. η συγκέντρωση της αγαρόζης. Υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στην ηλεκτροφορητική μετακίνηση του DNA και τη συγκέντρωση του πηκτώματος
3. η διαμόρφωση του DNA. Οι διάφορες μορφές του DNA (γραμμικό, κυκλικό, υπερελικωμένο, μη υπερελικωμένο) έχουν διαφορετική ηλεκτροφορητική συμπεριφορά που εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως η ισχύς του ηλεκτρικού ρεύματος, η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος, ο τύπος της αγαρόζης, κτλ.

4. το βρωμιούχο αιθίδιο. Η παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου στο πήκτωμα μειώνει το αρνητικό φορτίο του DNA και συνεπώς μειώνεται η κινητικότητα του περίπου κατά 15%
5. το εφαρμοζόμενο πεδίο. Όταν εφαρμόζεται πεδίο χαμηλής ισχύος, η μετακίνηση των μορίων είναι ανάλογη με την ισχύ.
6. το ρυθμιστικό διάλυμα. Συνήθως χρησιμοποιούνται τα ρυθμιστικά διαλύματα TAE (Tris- Acetic acid- EDTA) και TBE (Tris- Boric acid- EDTA). Το ρυθμιστικό διάλυμα προσφέρει την ιοντική ισχύ που απαιτείται για να γίνει η ηλεκτροφόρηση.

Για την οπτικοποίηση του DNA στο πήκτωμα χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο ενσωματώνεται κάθετα μεταξύ των βάσεων στη διπλή έλικα και σχηματίζει δεσμούς van der Waals με τις βάσεις που βρίσκονται άνωθεν και κάτωθεν της θέσης του. Ο φθορισμός επέρχεται μετά από διέγερση σε υπεριώδη ακτινοβολία, περίπου στα 300nm, ενώ η διακριτική ικανότητα είναι της τάξεως των 10 ng DNA (Sambrooketal., 2001)

3.3.2. Προετοιμασία του πηκτώματος και των δειγμάτων

Για το πήκτωμα αгарόζης 2%

- ζυγίζονται 0,6 gr αгарόζη και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη
- προστίθενται 40 ml TAE 1x.
- γίνεται διάλυση της αгарόζης στο φούρνο μικροκυμάτων
- αφού κρυώσει προστίθενται 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου (αρχική συγκέντρωση 10 mg/ml)

Το διάλυμα χύνεται σε εκμαγείο στο οποίο τοποθετούμε «χτενάκια» για τη δημιουργία των «πηγαδιών». Το πήκτωμα πήζει σε περίπου 20 λεπτά. Όταν πήξει, τα «χτενάκια» αφαιρούνται και το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE μέχρι την πλήρη κάλυψη των «πηγαδιών»

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιούνται 3 μl loading buffer (για τη σύσταση βλ. Παράρτημα) τα οποία αναμειγνύονται με 5 μl (από τα 30μl) από το προϊόν PCR

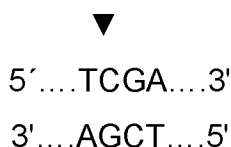
Για την ηλεκτροφόρηση παρέχεται συνεχές ρεύμα 100V για περίπου 30 λεπτά.

3.4. Μέθοδος RFLP

3.4.1. Πέψη με ένζυμο περιορισμού

Η μέθοδος RFLP βασίζεται στις περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες απομονώθηκαν από βακτήρια ως ένζυμα που προστατεύουν το βακτήριο από εξωγενές DNA αναγνωρίζοντας παλίνδρομες αλληλουχίες στο εξωγενές τμήμα και προκαλώντας τον τεμαχισμό τους. Οι αντίστοιχες αλληλουχίες του γενώματος του βακτηρίου προστατεύονται από τον τεμαχισμό με τροποποίηση των βάσεων τους. Έως τώρα έχουν ανακαλυφθεί πλήθος περιοριστικών ενδονουκλεασών οι οποίες αναγνωρίζουν τουλάχιστον 150 διαφορετικές θέσεις αναγνώρισης. Η αλληλουχία-στόχος έχει μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συνήθως είναι παλίνδρομη. Μετά τον τεμαχισμό τα άκρα μπορεί να είναι λεία ή προεξέχοντα.

Για την πέψη των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *TaqI* το οποίο αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία:



Για την πέψη χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της εταιρίας New England Biolabs:

- Ένζυμο *TaqI*
- ρυθμιστικό διάλυμα NEBuffer 4 (σύσταση 1x: 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9, 25°C)
- BSA (Bovine Serum Albumin, 100x)

Στον Πίνακα 4 παραθέτονται τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που απαιτήθηκαν

Πίνακας 4: Μείγμα αντιδραστηρίων για την πέψη με το ένζυμο *TaqI*

Αντιδραστήρια	Όγκος
Προϊόν PCR	2-5 µl (από τα 30 µl)
Buffer NEB4 (10x)	1 µl
BSA (100x)	0,1 µl
ddH ₂ O	6,7- 3,7 µl
Ένζυμο <i>TaqI</i> (20 u/µl)	0,2µl
Σύνολο	10 µl

Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 37°C.

3.4.2. Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Ο έλεγχος των προϊόντων της πέψης πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 8%. Το πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε είχε διαστάσεις 20cmx 20cm και γι' αυτό συνολικά απαιτήθηκαν 62,5 ml διαλύματος.

Για τα 62,5 ml:

- Ζυγίζονται 8 gr ουρία και διαλύονται σε 16,63 ml διαλύματος πολυακρυλαμίδης 30% (για τη σύσταση βλ. Παράρτημα)
- Προστίθενται 8,25 ml 10x TBE
- Προστίθεται 30 ml απιονισμένου H₂O
- Ακολουθεί ανάδευση
- Διήθηση του διαλύματος με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού
- Προσθήκη απιονισμένου H₂O μέχρι τα 62,5 ml
- Προσθήκη 62,5 μl TEMED (Tetramethylethylenediamine) και 400 μl διαλύματος APS (Ammonium persulfate) 20% για τον πολυμερισμό
- Στη συνέχεια γίνεται έντονη ανάδευση και ταχεία μεταφορά του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου τοποθετούνται τα «χτενάκια» για τη δημιουργία των ειδικών θέσεων όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα (Sambrook et al., 2001)

Ο πολυμερισμός του πηκτώματος έχει ολοκληρωθεί σε περίπου 45 λεπτά. Οι συνταγές των διαλυμάτων παρατίθενται στο Παράρτημα 1.

3.4.3. Ηλεκτροφόρηση

Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος αφαιρείται το «χτενάκι» και τα «πηγαδάκια» που δημιουργήθηκαν καθαρίζονται με μία καρφίτσα ώστε να αφαιρεθούν υπολείμματα που θα εμποδίσουν τη σωστή διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE μέχρι να καλυφθούν τα «πηγαδάκια».

Στη συνέχεια, προετοιμάζονται τα προϊόντα της πέψης για ηλεκτροφόρηση. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται όλο το προϊόν της

πέψης (10 μ l). Επιπλέον, γίνεται χρήση ενός DNA ladder ο οποίος θα υποδείξει το μέγεθος των τμημάτων DNA. Στην ηλεκτροφόρηση περιέχεται σαν μάρτυρας και ένα δείγμα με μη τεμαχισμένο προϊόν της PCR. Σε όλα προσθέτονται 5 μ l loading buffer (για τη σύσταση βλ. Παράρτημα).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 250 V και ολοκληρώνεται ~3 ώρες. (Sambrook et al., 2001)

3.4.4. Χρώση με νιτρικό άργυρο

Η χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης γίνεται με διάλυμα νιτρικού αργύρου. Ο άργυρος προσδένεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με τη φορμαλδεΐδη σε αλκαλικό pH. Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα 1

10 ml αιθανόλη 100%

0,5ml οξικό οξύ 99%

ddH₂O μέχρι τα 400ml

Αρχικά η πηκτή επωάζεται υπό ανάδευση με 200 ml από το Διάλυμα 1 για 3 λεπτά. Το διάλυμα αποχύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Στη συνέχεια ακολουθεί πλύση της πηκτής με ddH₂O για 1 λεπτό.

Διάλυμα 2

200ml διαλύματος AgNO₃ 0,1%

Στο δεύτερο στάδιο της χρώσης το πήκτωμα εμβαπτίζεται υπό ανάδευση στο Διάλυμα 2 για 8-10 λεπτά. Ακολουθούν δύο πλύσεις με ddH₂O, διάρκειας 1 λεπτού έκαστη.

Διάλυμα 3

3 gr NaOH

0,01 gr NaBH₄ (sodium borohydride)

1 ml φορμαλδεΐδη

ddH₂O ως τα 200ml

Στο τελευταίο στάδιο, προστίθεται το τρίτο διάλυμα μέχρις ότου να εμφανιστούν οι ζώνες του DNA. (Sambrook et al., 2001)

3.5. Στατιστική επεξεργασία

Μετά τη συλλογή των αποτελεσμάτων που προέκυψαν ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία αυτών.

Για τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών πραγματοποιήθηκε έλεγχος Kolmogorov-Smirnov για να διαπιστωθεί αν προσεγγίζουν ικανοποιητικά οι μεταβλητές την κανονική κατανομή. Μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney U test πραγματοποιήθηκε στις συνεχείς ποσοτικές μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Οι συχνότητες των αλληλόμορφων εκτιμήθηκαν με την μέθοδο καταμέτρησης των γονιδίων. Διεξήχθησαν δοκιμές χ^2 για να εξεταστεί κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Ο πολυμορφισμός VDR *TaqI* (rs731236; T/C) μελετήθηκε μη παραμετρικά, χρησιμοποιώντας 2 x 2 πίνακες συνάφειας και ειδικότερα χρησιμοποιώντας το Cochran–Armitage trend test καθώς και άλλα tests τα οποία βασίζονται σε υπολειπόμενη ή επικρατή δράση του γονιδίου. Οι ομάδες γονοτύπων μελετήθηκαν με το Fisher's exact test και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p \leq 0.05$. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρησιμοποίηση του στατιστικού προγράμματος SPSS 14 (Inc, Chicago, IL, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο πολυμορφισμός rs731236 του γονιδίου *VDR* που εντοπίζεται σε περιοχή του εξωνίου 9 με τη χρήση της τεχνικής της PCR- RFLP. Οι δύο παραλλαγές στο επίπεδο της αλληλουχίας του DNA είναι μία κυτοσίνη (C) στη θέση μίας θυμίνης (T) (T>C). Ο γενετικός τύπος που περιέχει τον πολυμορφισμό αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η διάκριση μεταξύ των ατόμων που φέρουν ή δεν φέρουν τον πολυμορφισμό στο γονιδίωμά τους. Το ένζυμο *TaqI* κόβει το δίκλωνο DNA όταν υπάρχει η κυτοσίνη (C).

Ο πολυμορφισμός *TaqI* είναι σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης με ένα μικροδορυφόρο στο 3'UTR. Το 3'UTR παίζει ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης κυρίως μέσω της ρύθμισης της σταθερότητας του mRNA, στους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, με εκτεταμένο 3'UTR. Εντούτοις, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν ο πολυμορφισμός *TaqI* έχει σχέση με τη σταθερότητα του mRNA (Uitterlinden et al., 2004).

4.2. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα

Στη συγκεκριμένη εργασία το δείγμα υπό μελέτη αποτελείται από 184 άτομα από την Βόρεια Ελλάδα, με υψηλό μέσο όρο ηλικίας, τα οποία προσήλθαν για κλινικές εξετάσεις κατά την χρονική περίοδο 2010-2011 στο Διαβητολογικό Κέντρο της Α' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ της Θεσσαλονίκης. Έπειτα από έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς στην μελέτη, δείγμα αίματος συλλέχθηκε και αναλύθηκε για την συλλογή κλινικών και βιοχημικών παραμέτρων (HDL, LDL, Τριγλυκερίδια) και την κατάταξη των ατόμων σε δύο διακριτές ομάδες: άτομα με Παχυσαρκία και άτομα χωρίς Παχυσαρκία.

Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των ατόμων σε Παχύσαρκα ή μη, ήταν ο Δείκτης Μάζας Σώματος (Body Mass Index, BMI), ο οποίος υπολογίστηκε διαιρώντας το Βάρος (kg) με το τετράγωνο του Ύψους (m^2) και η τιμή για την εμφάνιση παχυσαρκίας ορίστηκε σε $BMI \geq 30$, σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα (Caballero B., 2007).

Πίνακας 5:Κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων που έλαβαν μέρος στη μελέτη

	Μη παχύσαρκοι n=102	Παχυσαρκοι n=82	p*
Φύλο (Α/Θ)	43/59	28/54	0.435
Ηλικία	70,28±8,18	66,17±9,81	0,002
BMI (kg/m ²)	25,61±2,55	35,43±4,57	0,000
Περ.Μεσης	61,4±49,27	112,6±11,96	0,000
Περ.Ισχίων	105,37±8,93	115,96±17,26	0,000
Χοληστερόλη	170,52±38,78	178,07±36,04	0,2
LDL	107,54±32,385	106,48±34,84	0,515
HDL	50,91±14,79	48,16±15,77	0,162
Τριγλυκερίδια	107,57±47,04	158,11±56,229	0,00
Σακχ/δης Διαβήτη II	5/102	14/82	0,007

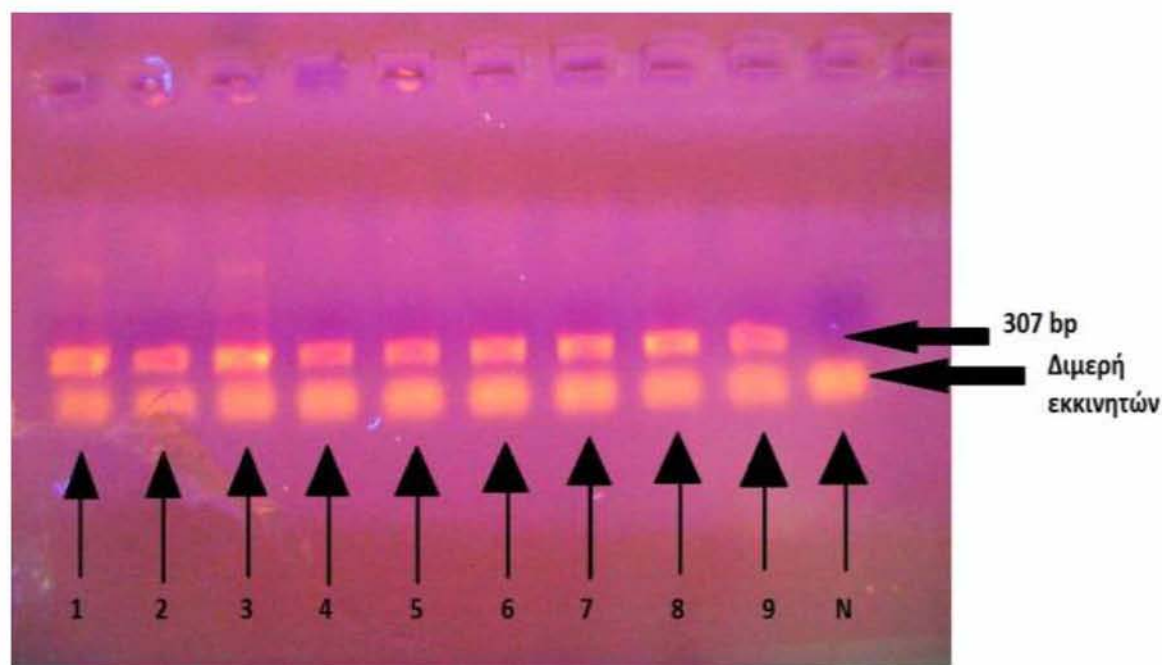
*Μη παραμετρικός έλεγχος Mann-WhitneyU πραγματοποιήθηκε στις συνεχείς ποσοτικές μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Στο σακχαρώδη διαβήτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος χ^2 .

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη. Όπως φαίνεται είναι αναμενόμενο, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του Δείκτη Μάζας Σώματος (B.M.I.) και της παχυσαρκίας. Το ίδιο ισχύει και για την περιφέρεια μέσης και την περιφέρεια ισχίων, καθώς και για το ποσοστό των τριγλυκεριδίων, όπως φαίνεται από τα p- values. Η εμφάνιση παχυσαρκίας είναι ανεξάρτητη του φύλου των ατόμων, ενώ εξαρτάται από την ηλικία τους. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στην παχυσαρκία και το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Επομένως, η εμφάνιση διαβήτη στα άτομα σχετίζεται με την εμφάνιση παχυσαρκίας.

4.3. Αποτελέσματα PCR

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR- RFLP και μελετήθηκε ο πολυμορφισμός του γονιδίου *VDR* που εντοπίζεται σε περιοχή του εξωνίου 9. Οι δύο παραλλαγές στο επίπεδο της αλληλουχίας του DNA είναι μία κυτοσίνη (C) στη θέση μίας θυμίνης (T) (T>C). Ο γενετικός τόπος που περιέχει τον πολυμορφισμό αναγνωρίζεται από το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η διάκριση μεταξύ των ατόμων που φέρουν ή δεν φέρουν τον πολυμορφισμό στο γονιδίωμά τους.

Το μήκος του τμήματος του γονιδίου *VDR*, που ενισχύθηκε με αντίδραση PCR, είναι 307bp. Ο έλεγχος των προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%, χρησιμοποιώντας 5 μl από τα 30μl της αντίδρασης. Στην Εικόνα 6 φαίνονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR.



Εικόνα 6: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR του γονιδίου *VDR*. Τα δείγματα 1-9 αντιστοιχούν σε άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη, ενώ το N είναι το δείγμα αρνητικού ελέγχου. Με τον αρνητικό έλεγχο επιβεβαιώθηκε η έλλειψη επιμολύνσεων στην αντίδραση.

Στα δείγματα που εμφάνιζαν ευκρινή ζώνη στην ηλεκτροφόρηση, και δεν είχαν παραπροϊόντα, έγινε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*, ώστε να διαπιστωθεί ο πολυμορφισμός που φέρουν.

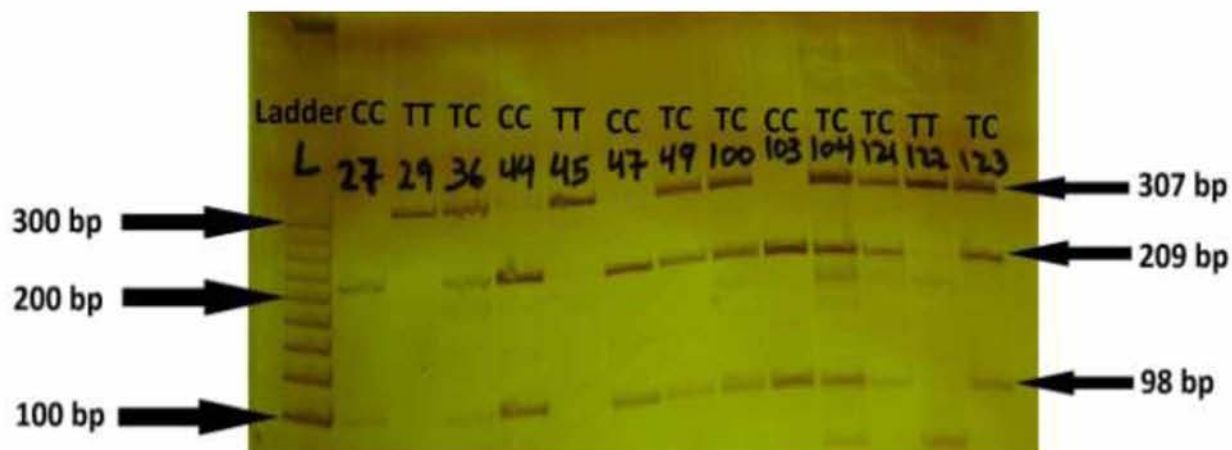
4.4. Αποτελέσματα RFLP

Για την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *TaqI* χρησιμοποιήθηκαν 2-5 μl (από τα 30 μl) του προϊόντος της PCR, ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος. Η πέψη του τμήματος των 307 bpt του γονιδίου *VDR* έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο μικρότερων τμημάτων με μήκη 98 bp και 209 bp. Μετά την πέψη τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού

(CC), άτομα ομόζυγα ως προς την απουσία της θέσης περιορισμού (TT), και ετερόζυγα άτομα (TC).

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένα από τα αποτελέσματα ανάλυσης της PCR-RFLP



Εικόνα 7: Αποτέλεσμα ανάλυσης PCR-RFLP. Στα αριστερά της εικόνας φαίνεται ο μάρτυρας (ladder) ενώ στο δεξιά παρουσιάζονται τα μεγέθη των ζωνών όπως αυτές προέκυψαν μετά από την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Στο πάνω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται οι γονότυποι.

Τα άτομα 29, 45 και 122 είναι ομόζυγα για την απουσία της θέσης αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο (TT), τα άτομα 27, 44, 47 και 103 είναι ομόζυγα ως προς την ύπαρξη θέσης περιορισμού (CC), ενώ τα υπόλοιπα άτομα εμφανίζονται ως ετερόζυγα (TC).

Στον Πίνακα 6 φαίνονται οι γονότυποι όλων των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη. Από τα 184 άτομα που έλαβαν μέρος στη μελέτη, προσδιορίστηκε ο γονότυπος των 171. Στα υπόλοιπα 13 άτομα, που χαρακτηρίστηκαν ως «απροσδιόριστα», δεν ήταν δυνατός ο έλεγχος του γονοτύπου, κυρίως λόγω προβλημάτων που παρουσιάστηκαν κατά την PCR.

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα στατιστικά δεδομένα της συσχέτισης του πολυμορφισμού *TaqI* του γονιδίου *VDR* και της παχυσαρκίας. Από τον πίνακα προκύπτει ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο αλληλόμορφο «T» και την εμφάνιση παχυσαρκίας ($p=0,019$). Συγκεκριμένα, η πιθανότητα τα παχύσαρκα άτομα να έχουν γονότυπο TT είναι 2 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα μη παχύσαρκα ($OR=2,07$)

Πίνακας 6: Γονότυποι των 184 ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη

A/A	Αποτέλεσμα	A/A	Αποτέλεσμα	A/A	Αποτέλεσμα	A/A	Αποτέλεσμα
1	TC	47	CC	93	CC	139	TT
2	TT	48	απροσδιόριστο	94	TC	140	TC
3	TT	49	TC	95	απροσδιόριστο	141	TT
4	TT	50	TC	96	TC	142	CC
5	TT	51	TC	97	TC	143	TC
6	TC	52	TC	98	TC	144	TC
7	TT	53	TC	99	απροσδιόριστο	145	TC
8	TT	54	TC	100	TC	C1	TC
9	TC	55	TC	101	TC	C2	TC
10	απροσδιόριστο	56	TT	102	TC	C3	TT
11	CC	57	TC	103	CC	C4	TC
12	απροσδιόριστο	58	TC	104	TC	C5	TC
13	TT	59	απροσδιόριστο	105	TC	C6	TC
14	TT	60	TT	106	TC	C7	TC
15	TT	61	TC	107	TC	C8	TC
16	CC	62	TC	108	TC	C9	TT
17	TC	63	TC	109	TC	C10	TC
18	TC	64	απροσδιόριστο	110	TT	C11	TT
19	CC	65	απροσδιόριστο	111	TT	C12	CC
20	TC	66	TT	112	TC	C13	απροσδιόριστο
21	TT	67	TT	113	CC	C14	TT
22	TC	68	TC	114	TT	C15	TT
23	TC	69	CC	115	TC	C16	CC
24	TT	70	TC	116	TC	C17	CC
25	TC	71	TT	117	TT	C18	TC
26	απροσδιόριστο	72	TC	118	TT	C19	απροσδιόριστο
27	CC	73	CC	119	TT	C20	CC
28	TC	74	CC	120	CC	C21	TT
29	TT	75	TC	121	TC	C22	TT
30	TC	76	TT	122	TT	C23	TC
31	TC	77	TT	123	TC	C24	TT
32	TT	78	TT	124	TC	C25	TT
33	TT	79	TC	125	TC	C26	TC
34	TC	80	TC	126	TC	C27	CC
35	TT	81	απροσδιόριστο	127	TT	C28	TT
36	TC	82	TT	128	TT	C29	TC
37	TT	83	TC	129	TT	C30	TC
38	TC	84	TT	130	TC	C77	TC
39	TT	85	απροσδιόριστο	131	TC	C101	TC
40	TC	86	TT	132	TC	C102	TC
41	TT	87	TC	133	TC	C103	TT
42	TT	88	TC	134	TC	C104	CC
43	TC	89	TC	135	TC	C105	TC
44	CC	90	TC	136	TT	C106	TT
45	TT	91	TC	137	TC	C107	TC
46	TC	92	CC	138	TC	C108	TC

Πίνακας 7: Συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *TaqI* του γονιδίου *VDR* και της Παχυσαρκίας

Γονίδιο, πολυμορφισμός	Τεστ	Μη παχύσαρκοι [BMI<30]	Παχύσαρκοι [BMI≥30]	P	OR (C.I. 95%)
VDR (TaqI-rs731236) T/C	Genotypic (TT/CT/CC)	29/59/14	37/35/10	0,059	1.09 (0.933 – 2.516)
	Cochran-Armitage (T/C)	117/87	109/55	0,074	0.955 (0.641 – 1.418)
	Dominant ([TT+TC]/CC)	88/14	72/10	0,759	1.145 (0.480 – 2.372)
	Recessive (TT/[TC+CC])	29/73	37/45	0,019	2.07 (1.123 – 3.816)

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζεται η συσχέτιση ανάμεσα στον αλληλόμορφο «Τ» και τα κλινικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν στον πίνακα 5, μόνο στα παχύσαρκα άτομα. Όπως φαίνεται στον πίνακα, το αλληλόμορφο «Τ» συσχετίζεται με τα ποσοστά της HDL και των τριγλυκεριδίων και συνεπώς, παίζει ρόλο στα αυξημένα ποσοστά τους στους παχύσαρκους. Αντιθέτως, η παρουσία του «Τ» αλληλομόρφου στα παχύσαρκα άτομα δεν σχετίζεται με την εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Εύλογο, από τα παραπάνω, συμπέρασμα είναι ότι αν και η εμφάνιση διαβήτη συσχετίζεται με την παχυσαρκία, όπως προέκυψε από τον πίνακα 5, αυτή δεν είναι συσχετισμένη με τον πολυμορφισμό *TaqI*. Το ίδιο ισχύει και για τα υπόλοιπα κλινικά χαρακτηριστικά.

Πίνακας 8: Συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *TaqI* του γονιδίου *VDR* και κλινικών παραμέτρων σε άτομα με Παχυσαρκία (n=82)

	VDR "TT"	VDR "TC+CC"	p*
Ηλικία	66,62±10,37	65,8±9,43	0,692
Περ.Μεσης	113,16±11,3	112,13±12,59	0,874
Περ.Ισχίων	120,03±21,17	112,62±12,5	0,225
Χολεστερόλη	180,65±36,94	175,96±35,56	0,586
LDL	100,49±26,32	111,4±40,16	0,25
HDL	52,29±16,77	44,76±14,2	0,032
Τριγλυκερίδια	172,65±53,67	146,16±56,04	0,016
Σακχ. Διαβήτης II	8/37	6/45	0,321

Μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney U πραγματοποιήθηκε όπου αυτό κρίθηκε ως απαραίτητο. Στο σακχαρώδη διαβήτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος χ².

4.5. Συμπεράσματα

Από την ανάλυση των παραπάνω δεδομένων μπορούμε να προβούμε σε ορισμένα συμπεράσματα:

- Η εμφάνιση παχυσαρκίας συσχετίζεται με το Δ.Μ.Σ., την περιφέρεια μέσης και ισχύων, την ηλικία, τα επίπεδα χολιστερόλης και τριγλυκεριδίων στο αίμα.
- Επίσης, η παχυσαρκία συσχετίζεται με την εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2.
- Το αλληλόμορφο «Τ» του πολυμορφισμού *TaqI* του γονιδίου *VDR* συσχετίζεται με την εμφάνιση παχυσαρκίας, αλλά είναι ανεξάρτητο από την εμφάνιση διαβήτη.
- Υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο «Τ» αλληλόμορφο και τα επίπεδα HDL και τριγλυκεριδίων στα παχύσαρκα άτομα
- Λόγω της ανισορροπίας σύνδεσης του πολυμορφισμού *TaqI* και του 3'UTR του γονιδίου *VDR*, υποθέτουμε ότι ίσως η συσχέτιση του πολυμορφισμού *TaqI* με την παχυσαρκία να οφείλεται στη σταθερότητα του mRNA του *VDR*. Για την επαλήθευση της συγκεκριμένης υπόθεσης είναι απαραίτητο να γίνουν περισσότερες μελέτες.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

50x TAE

- 121 gr Tris- base
- 28,5 gr Acetic acid
- 50 ml EDTA 0,5M
- ddH₂O ως τα 500 ml

10x TBE

- 108 gr Tris- base
- 55 gr Boric acid
- 40 ml EDTA 0,5M
- ddH₂O ως το 1 lt

APS 20%

- 2 gr Ammonium persulfate
- ddH₂O ως τα 10 ml

Loading Buffer (6x)

- 1 ml Bromophenol Blue 1% w/v
- 1ml 10x TBE
- 5ml Glycerol 100%
- ddH₂O ως τα 100 ml

Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)

- 10 mg EtBr
- 1 ml ddH₂O

TEMED

(Tetramethylethylenediamine)

- έτοιμο διάλυμα συγκέντρωσης 99%

Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%

- 29 gr ακρυλαμίδη 99%
- 1 gr δισ- ακρυλαμίδη
- ddH₂O ως τα 100 ml

AgNO₃ 1 gr/l

- 1 gr AgNO₃
- 1 ltddH₂O

Βιβλιογραφία

1. Awad A B., Alappat L & Valerio M, Vitamin D and Metabolic Syndrome Risk Factors: Evidence and Mechanisms, 2012, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 52:103–112
2. Baker A R, McDonnell D P, Hughes M, Crisp T M, Mangelsdorf D J, Haussler M R, Pike J W, Shine J, and O'Malley B W, Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 3294 – 3298.
3. Bell Christopher G., Walley Andrew J. and Froguel Philippe, The genetics of human obesity, Nature Reviews Genetics, 2005, Vol 6
4. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. Epidemiol Rev. 2007;29:1-5. Epub 2007
5. Delrue M-A, Michaud JL, Fat chance: genetic syndromes with obesity, 2004, Clinical Genetics, 66: 83–93
6. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S., Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency, 2002, The Journal of Clinical Investigation, Volume 110, Number 8
7. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S., Clinical Spectrum of Obesity and Mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene, 2003, The New England journal of medicine, vol. 348 no. 12
8. Farooqi I.S. and O'Rahilly S., Monogenic Human Obesity Syndromes, 2004, Prog Brain Res 153:119–125
9. Goldstone AP., Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment, 2004, TRENDS in Endocrinology and Metabolism, Vol.15 No.1
10. Haslam David W, James W Philip T, Obesity, Lancet 2005; 366: 1197-209
11. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW., The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed, 1998, Journal of Bone and Mineral Research, Volume 13, Number 3

12. Hinney A., Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter A-K, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schäfer H, Gudermann T and Hebebrand J, Melanocortin-4 Receptor Gene: Case-Control Study and Transmission Disequilibrium Test Confirm that Functionally Relevant Mutations Are Compatible with a Major Gene Effect for Extreme Obesity, 2003, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 88 no. 9, 4258-4267
13. Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, Brumm H, Reichwald K, Lichtner P, Scherag A, Nguyen TT, Schlumberger P, Rief W, Vollmert C, Illig T, Wichmann HE, Schäfer H, Platzer M, Biebermann H, Meitinger T, Hebebrand J. Prevalence, Spectrum, and Functional Characterization of Melanocortin-4 Receptor Gene Mutations in a Representative Population-Based Sample and Obese Adults from Germany, 2006, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism vol. 91 no. 5, 1761-1769
14. Hinney Anke, Vogel Carla I. G., Hebebrand Johannes, From monogenic to polygenic obesity: recent advances, 2010, Eur Child Adolesc Psychiatry, 19:297–310
15. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F., Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice, 1997, Cell, Vol. 88, 131–141
16. Kapantais E, Tzotzas T, Ioannidis I, Mortoglou A, Bakatselos S, Kaklamanou M, Lanaras L, Kaklamanos I., First National Epidemiological Survey on the Prevalence of Obesity and Abdominal Fat Distribution in Greek Adults., , 2006, Annuals of Nutrition and Metabolism, 50:330–338
- Köstner K, Denzer N, Müller C.S.L., Klein R, Tilgen W and Reichrath J, The Relevance of Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms for Cancer: A Review of the Literature, 2009, Anticancer Research 29: 3511-3536
17. Lubrano-Berthelier C, Durand E, Dubern B, Shapiro A, Dazin P, Weill J, Ferron C, Froguel P, Vaisse C., Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations, 2003, Human Molecular Genetics, Vol. 12, No. 2

18. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S., Congenital Leptin Deficiency is Associated With Severe Early-Onset Obesity in Humans, 1997, *Nature*, 387: 903-908
19. Mutch David M., Clement Karine, Unraveling the Genetics of Human Obesity, *PLoS Genetics*, 2006, Vol 2, Issue 12, e188
20. Palomer X, González-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D., Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Diabetes*, 2008, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10, 185–197
21. Peeters Anna, Barendregt Jan J., Willekens Frans, Mackenbach Johan P., Al Mamun Abdullah and Bonneux Luc, Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis, 2003, *Annals of Internal Medicine*, p.24-32
22. Schousboe K, Visscher PM, Erbas B, Kyvik KO, Hopper JL, Henriksen JE, Heitmann BL, Sørensen TI., Twin study of genetic and environmental influences on adult body size, shape, and composition, 2004, *International Journal of Obesity*, 28, 39–48
23. Seidell Jacob C, Flegal Katherine M, Assessing Obesity: classification and epidemiology, *British Medical Bulletin*, 1997; 53 (No 2): 238-252
24. Tzotzas T, Kapantais E, Tziomalos K, Ioannidis I, Mortoglou A, Bakatselos S, Kaklamanou M, Lanaras L and Kaklamanos I, Epidemiological Survey for the Prevalence of Overweight and Abdominal Obesity in Greek Adolescents, 2008, *Obesity*, 16, 1718–1722
25. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP., Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms, 2004, *Gene*, 338, 143–156
26. Walley Andrew J, Asher Julian E, Froguel Philippe, The genetic contribution to non- syndromic human obesity, *Nature Reviews Genetics*, 2009
27. Yang W, Kelly T. and He J., Genetic Epidemiology of Obesity, 2007, *Epidemiologic Reviews*, Vol. 29
28. Ye Wei-Zhen, Reis Andre F, Dubois-Laforgue Daniele, Bellanne-Chantelot C, Timsit J and Velho G, Vitamin D receptor gene

polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset, 2001, European Journal of Endocrinology, 145 181-186

29. Zhang Yiyang, Proenca Ricardo, Maffei Margherita, Barone Marisa, Leopold Lori & Friedman Jeffrey M., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, 1994, Nature, Vol 372
30. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P, Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, Δεύτερη Έκδοση, 2006, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη
31. Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A laboratory manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
32. WHO, Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic, Geneva, 2000
33. www.wikipedia.org
34. World Health Organization, www.who.int